

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 705 685

②1 N° d'enregistrement national : 93 06437

⑤1 Int Cl⁵ : C 12 N 1/20 , 9/02 , A 61 K 7/48 , 35/80 , A 23 L 1/337

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 28.05.93.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 02.12.94 Bulletin 94/48.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : VILLE D'AMELIE-LES-BAINS-
PALALDA — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Gudin Claude.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf
Warcoin Ahner.

⑤4 Biomasse microalgale, ses extraits, sod, compositions les contenant et procédés faisant appel à ces produits.

⑤7 L'invention concerne une biomasse microalgale essentiellement pure, caractérisée en ce qu'elle est constituée de cyanobactéries de l'espèce *Mastigocladus laminosus*. Elle concerne également un extrait de microalgues et une SOD thermostable et/ou thermotolérante obtenue par extraction.

L'invention se rapporte également à des compositions dermocosmétiques, ou pharmaceutiques, à des boues mûrues ou des additifs alimentaires contenant les microalgues ou leurs extraits.

Elle se rapporte enfin à des procédés pour améliorer l'état de la peau saine ou d'un sujet sain et son confort locomoteur ou général.

FR 2 705 685 - A1



La présente invention se rapporte à un phytoplancton, présent notamment dans les eaux thermales, et qui possède un ensemble de caractéristiques le rendant particulièrement approprié pour des utilisations dans les domaines thérapeutiques et cosmétologiques.

5 Les eaux thermominérales sont par définition des eaux minérales naturelles d'intérêt dans lesquelles au moins deux facteurs concourent aux activités pharmacologiques. Ce sont d'une part la minéralisation qui est actuellement le domaine le mieux défini et d'autre part le plancton thermal qui a été jusqu'à présent peu étudié du point de vue de sa
10 composition biologique et de ses composés actifs.

Dans toutes les eaux thermominérales on rencontre du plancton en plus ou moins grande quantité. C'est donc un milieu vivant. Or on sait que dans un milieu vivant (eau douce, eau de mer, milieu terrestre) de multiples interactions (compétition, auto ou hétéroantagonisme)
15 définissent l'équilibre du milieu. Le milieu thermal en tant que milieu vivant n'échappe pas à la règle de la concurrence entre espèces. On sait également que les interactions définies ci-dessus s'effectuent à l'aide de médiateurs chimiques (terpènes, peptides, alcaloïdes, etc...). Ces molécules agissent sur les systèmes biochimiques des espèces voisines, soit en
20 stimulant leur croissance (stimuline), soit le plus souvent en les inhibant (antimitotiques) ou en les éliminant (toxines). Dans ce dernier cas ces molécules sont des substances de défense. De tels médiateurs chimiques ont une incidence sur les organismes plus évolués comme l'homme et peuvent conduire à des activités thérapeutiques.

25 On a montré que la peau des mammifères (dont l'homme) est perméable non seulement aux substances minérales mais aussi à certaines substances organiques. En l'occurrence certaines molécules contenues dans l'eau thermique et excrétées par le plancton sont susceptibles d'être absorbées par la peau. Ceci a déjà été montré par le Professeur Lefèvre de
30 1964 à 1975 lorsqu'il constate qu'une espèce planctonique récoltée aux stations de Dax et Barèges (*Phormidium uncinatum*) et cultivée dans son Laboratoire avait des propriétés bactéricides et cicatrisantes. Un tel résultat était obtenu aussi bien à partir du plancton lui-même qu'à partir

du jus de culture, ce qui démontrait que cette espèce excrétaient des substances chimiques dans le milieu susceptible de diffuser à travers le corps humain. Le Professeur Lefèvre a donné le nom de cyanostimulines aux substances excrétées par *Phormidium uncinatum* parcequ'elles
5 permettaient aux plaies d'être nettoyées et aux tissus de se régénérer. Mais ce dernier n'a pu isoler le ou les molécules responsables de cette activité. Aucun chercheur n'a pu encore isoler des molécules à activité biologique dans les eaux chaudes.

Il serait donc souhaitable de pouvoir disposer d'un phytoplancton
10 thermophile, dont les propriétés seraient maintenues dans les conditions d'utilisation du thermalisme, c'est-à-dire à des températures supérieures ou égales à 37° C, pendant un temps suffisamment long.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet une biomasse microalgale essentiellement pure, caractérisée en ce qu'elle est constituée
15 de cyanobactéries de l'espèce *Mastigocladus laminosus*.

Mastigocladus laminosus est une cyanobactérie dont le thalle spongieux atteint un maximum de développement entre 30 et 60° C. Elle est présente dans les eaux thermales de surface d'Amélie-les-bains (France).

Les algues utilisées de manière générale en cosmétologie sont
20 obtenues par cueillette aquatique marine ou par culture en système lagunaire. Il s'agit donc toujours de produits mal définis car pratiquement impossible à purifier et non thermophiles.

Au contraire, la biomasse microalgale selon l'invention, qui peut être obtenue, par exemple, par culture en photoréacteur tubulaire clos à
25 écoulement continu, est constituée d'une seule espèce, thermophile. *Mastigocladus laminosus* synthétise des molécules thermostables, avec un rendement élevé, qui permet en outre leur extraction à l'échelle industrielle. C'est une cyanobactérie filamenteuse qui peut résister, d'une part aux contraintes d'utilisation comme la chaleur du corps sans se
30 dégrader partiellement et perdre de son efficacité ; ceci permet de l'utiliser soit pure en application locale cutanée, soit en balnéothérapie ou pour enrichir des boues. D'autre part, elle peut résister aux diverses manipulations nécessaires à la préparation et/ou à la conservation de produits bruts ou d'extraits sans dénaturer les molécules d'intérêt.

Parmi les composants d'intérêt de la biomasse de *Mastigocladus laminosus*, il faut citer des pigments : la phycoérythrocyanine et la phycocyanine, qui sont des phycobiliprotéines, ainsi que des caroténoïdes.

Par ailleurs, la biomasse microalgale selon l'invention présente une
5 activité superoxyde-dismutase thermostable et/ou thermotolérante. Par thermostable et/ou thermotolérante, on entend une activité superoxyde-dismutase qui persiste au moins partiellement après un traitement à une température supérieure à 60°C pendant environ 10 min.

L'activité superoxyde-dismutase (SOD) s'exerce sur les ions
10 superoxydes dont elle induit la dismutation et confère des propriétés anti-radicalaires aux produits. Il a été montré par exemple dans FR 2 287 899 que cette activité SOD est recherchée en cosmétique, et notamment pour ses propriétés antiviellissement ou de protection contre les rayons UV.

L'activité anti-radicalaire de la SOD la rend particulièrement
15 appropriée dans deux types majeurs d'applications, à savoir comme anti-inflammatoire et pour lutter contre le vieillissement.

Cependant, il s'agit généralement d'une enzyme inactivée par la chaleur.

L'un des avantages de l'activité SOD manifestée par la biomasse de
20 *Mastigocladus laminosus*, est sa thermotolérance, l'activité étant maintenue à 60% environ après un traitement à une température de 64° C. Elle présente donc une activité optimale aux températures d'utilisation d'environ 40° C, soit lors d'applications locales, sur la peau humaine, pure ou en mélange avec des boues thermales, soit pour l'ensemencement de
25 péloïdes à maturer.

La biomasse peut ensuite être traitée en vue de sa conservation, par stérilisation et/ou lyophilisation. De plus, les techniques d'extraction et/ou de séparation des fractions actives faisant appel au chauffage pourront être employées sans dommage.

30 Enfin, un autre intérêt de la biomasse selon l'invention est sa teneur élevée en SOD, qui est de l'ordre de 3 à 6 unités NBT/mg de matière sèche, mesurée selon la technique de Winterbourn et al (J. Lab. Clin. med. 85(2) 337-341, 1975). La biomasse jeune de *M. laminosus* est plus riche que la biomasse en phase stationnaire de croissance.

35

La présente invention a donc également pour objet un extrait de microalgues caractérisé en ce qu'il est issu de cyanobactéries de l'espèce *Mastigocladus laminosus*. Plus particulièrement, elle a pour objet un extrait qui présente une activité superoxyde-dismutase résistant à une température d'environ 64°C.

L'invention comprend les applications esthétiques, anti-
vieillessement, anti-inflammatoire et d'amélioration du bien-être général de la biomasse de *Mastigocladus laminosus* ou de ses extraits.

La biomasse pure de *Mastigocladus laminosus* ou des extraits, peuvent servir à préparer des compositions dermo-cosmétiques.

Par composition dermo-cosmétique on entend des préparations destinées à être appliquées sur la peau du visage ou du corps. Elles peuvent être réalisées de façon extemporanée et être constituées essentiellement de la biomasse de *Mastigocladus laminosus*, que l'on maintient en contact avec la peau à une température de l'ordre de 35 à 45° C. A cette température, les propriétés du thermoplancton ne sont pas altérées. Son action sur la peau s'exerce notamment dans les cas de surcharge adipeuse (qu'elle contribue à réduire tout en améliorant l'aspect inesthétique en "peau d'orange") et/ou de vieillissement, et/ou de confort locomoteur ou de bien-être.

L'invention comprend également des boues thermales enrichies avec de la biomasse de *Mastigocladus laminosus* ou ses extraits présentant une activité SOD, et/ou maturées après ensemencement avec ladite biomasse. Les indications demeurent les mêmes.

Elle comprend enfin des compositions sous forme de lotions, crèmes, onguents conditionnées et contenant de la biomasse de *Mastigocladus laminosus* ou des extraits présentant une activité SOD thermotolérante et/ou thermostable, facultativement en association avec d'autres principes actifs et/ou des excipients cosmétologiquement acceptables.

De telles compositions peuvent notamment être utilisées pour retarder ou prévenir le vieillissement de la peau, ou comme anti-solaire pour aider à lutter contre les dommages causés à la peau par le rayonnement U.V et/ou dans le but de favoriser le confort locomoteur et le bien être général.

Ces compositions pourront avantageusement être stérilisées par la chaleur pour améliorer leur conservation avec maintien des propriétés et en particulier de l'activité SOD.

5 La biomasse microalgale de *Mastigocladus laminosus* ou ses extraits présentant une activité SOD thermotolérante sont également utiles à titre de médicament. C'est pourquoi la présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique contenant une telle biomasse ou ses extraits.

10 Elle sera notamment utile pour le traitement d'affections dermatologiques et/ou comme traitement d'appoint en rhumatologie (action anti-inflammatoire), notamment chez un sujet atteint d'arthropathie dégénérative, en vue d'atténuer ou maîtriser la douleur secondaire et l'évolution lésionnelle.

15 L'invention concerne également un additif alimentaire caractérisé en ce qu'il contient de la biomasse microalgale essentiellement pure, constituée de cyanobactéries de l'espèce *Mastigocladus laminosus* présentant de préférence une activité SOD thermostable et/ou thermotolérante, un extrait issu de cyanobactéries de l'espèce *Mastigocladus laminosus* et présentant une activité superoxyde-dismutase
20 résistant à une température d'environ 64°C, ou une SOD purifiée préparée à partir de ces produits.

Elle concerne aussi un procédé pour améliorer l'état de la peau saine, en particulier vieillissante, caractérisé en ce qu'on applique localement une composition contenant au moins des microalgues de
25 l'espèce *Mastigocladus laminosus*, ou un extrait desdites microalgues présentant une activité superoxyde-dismutase, à une température d'environ 35 à 45° C.

Elle concerne un procédé pour améliorer les performances d'un sujet sain caractérisé en ce qu'on administre par voie locale et/ou orale
30 une biomasse microalgale, un extrait, ou une SOD tels que définis ci-dessus, notamment sous forme de composition dermo-cosmétique, pharmaceutique ou localement de boue maturée ; les additifs alimentaires obtenus à partir de *Mastigocladus laminosus* favorisent la résistance physique ou intellectuelle de sujets sains exposés à des conditions
35 d'agression.

Elle concerne enfin un procédé pour enrichir des eaux destinées à la balnéothérapie, caractérisé en ce qu'on introduit dans l'eau ou le fluide dans lequel le sujet sera immergé, une biomasse microalgale essentiellement pure, constituée de cyanobactéries de l'espèce Mastigocladus laminosus présentant de préférence une activité SOD thermostable et/ou thermotolérante, un extrait issu de cyanobactéries de l'espèce Mastigocladus laminosus et présentant une activité superoxyde-dismutase résistant à une température d'environ 64°C, ou une SOD purifiée préparée à partir de ces produits.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture de l'exemple qui suit. Dans cet exemple, on se référera à la figure en annexe qui représente le spectre de dosage par chromatographie de la biomasse de Mastigocladus laminosus

Exemple : Obtention et caractérisation d'une biomasse de Mastigocladus laminosus

La souche de Mastigocladus laminosus provenant de la collection de l'Institut Pasteur (référence 7521) a été mise en culture dans des réacteurs aérés de deux litres.

Une culture axénique est obtenue. Cette Cynaobactérie filamenteuse se présente en milieu liquide sous forme d'agrégats étoilés de 5 à 15mm de diamètre. Ces derniers peuvent à leur tour s'accoler en donnant naissance à de gros amas de plusieurs centimètres. Au début, cette microalgue a tendance à coller à la paroi du réacteur en formant des voiles qui peuvent se détacher avec le bullage et participer à la formation des amas, notamment à la surface de la culture ; après acclimatation, elle est plus homogène, ce qui permet sa culture en mode continu.

Les conditions de culture optimales sont les suivantes :
- milieu nutritif BGII

Composition du milieu BGII :

	NaNO ₃	1,5	g/l
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,075	g/l
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,036	g/l
5	K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	0,04	g/l
	acide citrique	0,006	g/l
	Na ₂ CO ₃	0,02	g/l
	Fe-EDTA	0,02	g/l
	Microéléments	1	ml/l

Solution de microéléments :

	H ₃ BO ₃	2,860	g
	MnCl ₂ , 4H ₂ O	1,810	g
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,220	g
15	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,080	g
	MoO ₃ 85%	0,036	g
	CoSO ₄ , 7H ₂ O	0,090	g
	Eau distillée qsp	1000	ml

- 20 - température = 45° C,
 - lumière = 5 000 lux sans photopériode
 - CO₂ = 1% en mélange dans l'air,
 - aération = 10 volume d'air/volume de culture/heure (VVH)
 - pH 8

25 Dans ces conditions, le facteur multiplicatif après 9 jours de culture est de 17,5. La concentration obtenue est alors de 0,378 g de matière sèche/litre de culture.

La productivité attendue en photoréacteur tubulaire est donc de 10 g/m²/jour.

30 La biomasse obtenue avec cette culture a été utilisée pour doser la SOD et les phycobiliprotéines.

La figure en annexe montre le spectre obtenu par analyse chromatographique. Elle montre l'existence de 3 pics et 2 épaulements. Les pics 1 et 5 respectivement aux longueurs d'onde 438 et 678 nm (nanomètres) indiquent la présence de la Chlorophylle a.

5 L'épaulement n°2 à 494 nm correspond aux caroténoïdes. Ceux-ci, bien que présents, sont minoritaires.

Enfin, l'épaulement n°3 et le pic n°4, aux longueurs d'ondes respectives 582 et 618 nm, correspondent à l'absorbance des phycobiliprotéines.

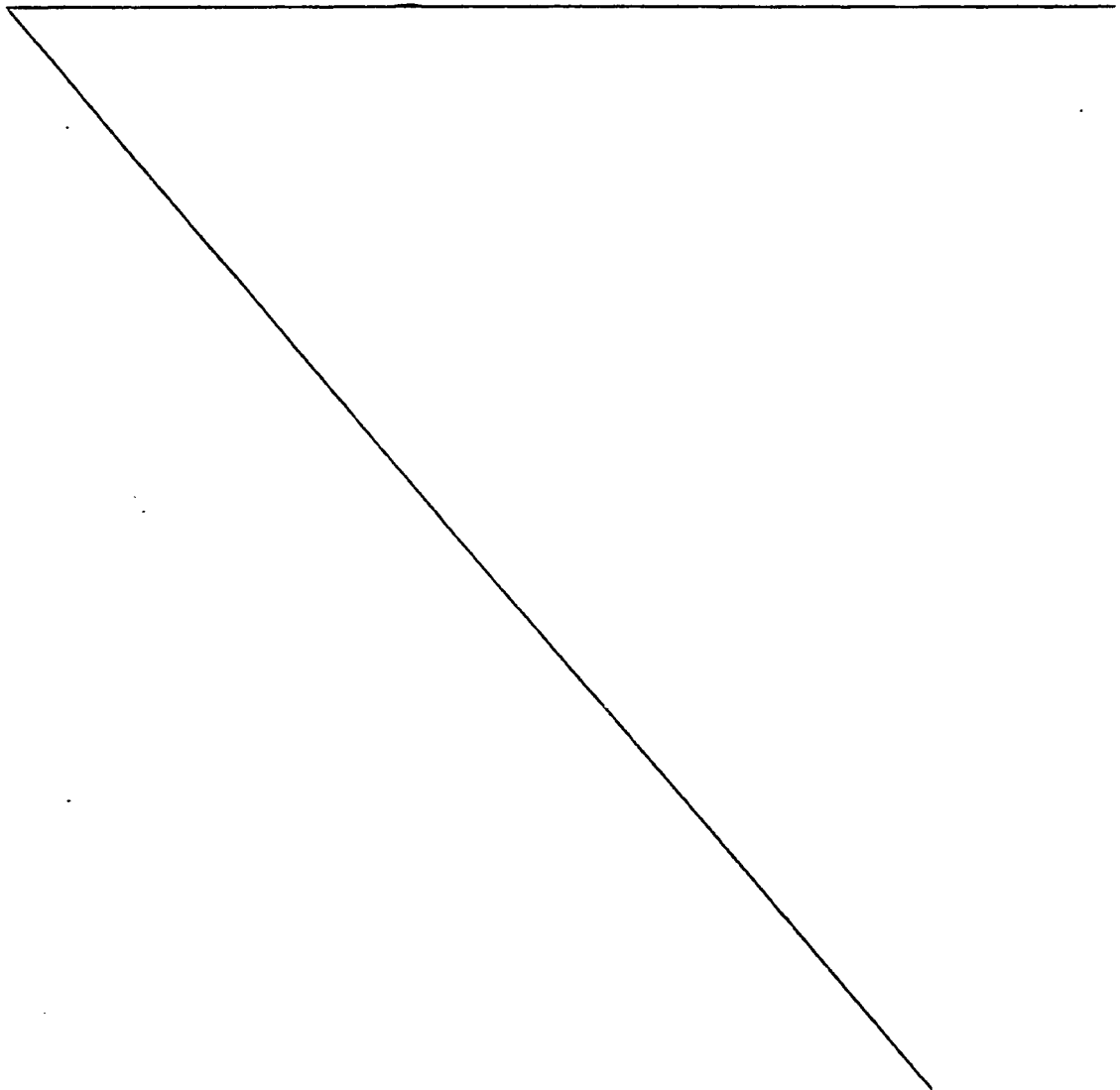
10 Le pic n°4 est celui de la phycocyanine, pigment bleu. L'épaulement n°3, d'après la littérature (KINGSLEY S. ROWAN, Photosynthetic pigments of algae, Cambridge University Press, Cambridge), semble s'apparenter à l'absorbance de la phycoérythrocyanine. Cette molécule, de la famille des
15 phycobiliprotéines, est un pigment rouge rencontré chez les Cyanobactéries.

L'extraction des pigments a été réalisée par broyage des cellules à la presse de French (2 passages) et centrifugation (10 min à 5000 tours par
20 minute). La courbe en pointillés est le spectre du culot obtenu après centrifugation. Il contient les débris cellulaires et montre que la totalité des pigments a été extraite hormis un reste de chlorophylle (petit pic à 438 et 680 nm). Le dosage quantitatif de la phycocyanine et la phycoérythrocyanine nécessite la recherche des coefficients d'extinction
25 spécifique dans la littérature ou la purification totale de ces pigments par des méthodes de chromatographie. En effet, ces coefficients sont propres à chaque espèce et varient même suivant le protocole d'extraction.

Le dosage de la SOD a été effectué selon la méthode au NBT. Dans les conditions de culture décrites précédemment, la SOD est présente à raison de 4 unités par mg de matière sèche. A titre de comparaison,
30 *Porphyridium cruentum*, une des microalgues les plus riches en SOD, en contient 5.

Il est important de noter que l'excellent comportement de *Mastigocladus laminosus*, observé dans un réacteur aéré de deux litres (conditions qui se rapprochent le plus possible des réacteurs tubulaires) permet d'envisager favorablement la culture en photoréacteur. En effet, la taille des agrégats, largement inférieure au diamètre de la tubulure, n'est pas un obstacle.

Le type de matériau utilisé actuellement sur les photorécepteurs n'admet pas une température de culture supérieure à 40-45°. Celle-ci ne doit pas être incompatible avec la culture de Cyanobactéries thermophiles, d'où l'intérêt de déterminer la température minimale pour laquelle on observe une croissance optimale de la souche.



REVENDICATIONS

1. Biomasse microalgale essentiellement pure, caractérisée en ce qu'elle est constituée de cyanobactéries de l'espèce *Mastigocladus laminosus*.

2. Biomasse microalgale selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle présente une activité superoxyde-dismutase, thermotolérante et/ou thermostable.

3. Extrait de microalgues caractérisé en ce qu'il est issu de cyanobactéries de l'espèce *Mastigocladus laminosus* et présente une activité superoxyde-dismutase résistant à une température d'environ 64°C.

4. Superoxyde-dismutase (SOD) obtenue par extraction à partir d'une biomasse selon l'une des revendications 1 ou 2.

5. Composition dermo-cosmétique caractérisée en ce qu'elle contient une biomasse microalgale selon l'une des revendications 1 ou 2, ou un extrait selon la revendication 3 ou une SOD selon la revendication 4.

6. Composition dermo-cosmétique selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle consiste essentiellement en microalgues de l'espèce *Mastigocladus laminosus*.

7. Composition dermo-cosmétique selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle contient en outre des excipients cosmétologiquement acceptables.

8. Boue maturée, caractérisée en ce qu'elle estensemencée par une biomasse microalgale selon l'une des revendications 1 et 2.

9. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient une biomasse microalgale selon l'une des revendications 1 ou 2, un extrait selon la revendication 3 ou une SOD selon la revendication 4.

10. Additif alimentaire caractérisé en ce qu'il contient de la biomasse microalgale selon l'une des revendications 1 ou 2, un extrait selon la revendication 3 ou une SOD selon la revendication 4.

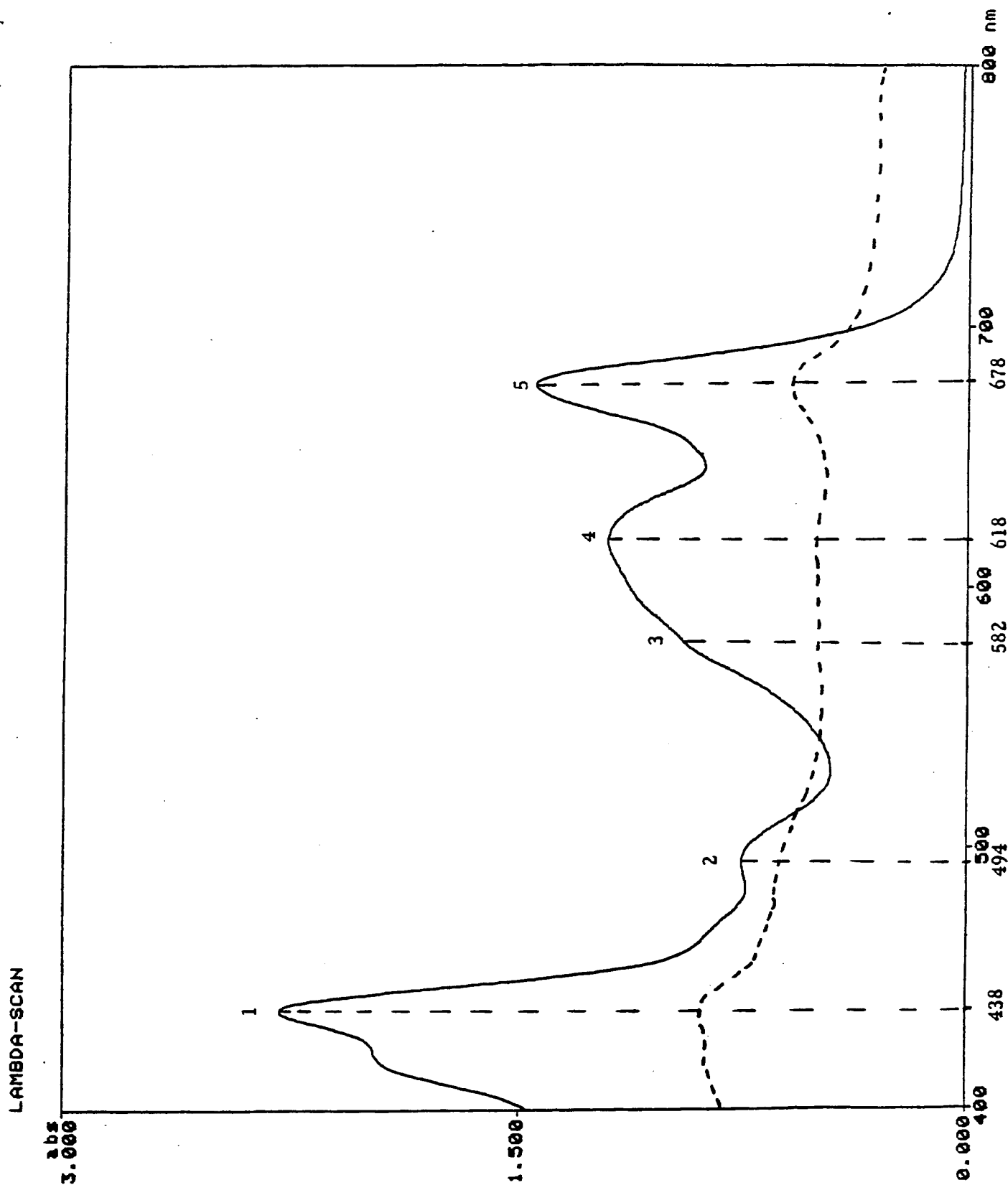
11. Procédé pour améliorer l'état de la peau saine, caractérisé en ce qu'on applique localement une composition contenant au moins des microalgues de l'espèce *Mastigocladus laminosus*, ou un extrait desdites microalgues présentant une activité superoxyde-dismutase, à une température d'environ 35 à 45° C.

12. Procédé pour améliorer les performances d'un sujet sain caractérisé en ce qu'on administre par voie locale à la température de 35 à 45° C et/ou orale un produit selon l'une des revendications 1 à 4, ou une composition selon l'une des revendications 5 à 8.

13. Procédé pour enrichir des eaux destinées à la balnéothérapie, caractérisé en ce qu'on introduit dans l'eau une biomasse selon l'une des revendications 1 et 2, un extrait selon la revendication 3 ou une superoxyde-dismutase selon la revendication 4.

15

FIGURE 1



INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 485498
FR 9306437

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	EP-A-0 437 393 (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AL.) * le document en entier *	1-12
Y	LIFE SCIENCES COLLECTION, Cambridge, MD Ab.No.82001571816 Hall, D.O. Use of immobilized cyanobacteria... & ENERGY FROM BIOMASS -- 1.. Grassi, G.; Zibetta, H. (eds.)	1-12
A	JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY, vol.3, no.2, 1991 pages 159 - 167 Wilde E W; Benemann J R; Weissman J C; Tillett D M 'Cultivation of algae and nutrient removal in a waste heat utilization process - cyanobacterium e.g. Mastigocladus laminosus culture in thermal waste-water; waste heat utilization for potential application to energy, fertilizer and high value product production' * le document en entier *	1,3-5,8
A	US-A-5 011 604 (WILDE, EDWARD W. ET AL.) * colonne 4, ligne 55 - ligne 56; revendications 1-13 *	1,3-5,8
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)
		C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
8 Février 1994		Gurdjian, D
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1
EPO FORM 1503 03.82 (F04C13)